猫の乳腺腫瘍に対する内因性腫瘍壊死因子誘導治療

中田陽子 前田貞俊 宮守美由紀 高橋 忠
森山 晃 桑原正人

日本大学生物資源科学部獣医放射線学研究室（〒252 藤沢市亀井野 1866）

（1996年5月21日受付・1996年12月13日受理）

要 約

乳腺腫瘍を有する高齢雌猫3例に対して、内因性腫瘍壊死因子（TNF）誘導療法を試みた。肺転移像を認めた腺癌の1例では、TNF誘導後1週に腫瘍は有意に退縮して凝固壊死像がみられ、全身状態が著しく改善され、胸水は減少した。他の2例では、TNF誘導後3週に腫瘍は著明に退縮した。治療後、腫瘍内の貯留液中に若干のTNF活性が認められた。——キーワード：猫、乳腺腫瘍、TNF誘導療法。

-----日獣会誌 50, 161~164 (1997)

腫瘍壊死因子（TNF）は *in vitro* において腫瘍細胞に対して特異的に細胞傷害性を示し、*in vivo* においては腫瘍血管に作用して腫瘍に中心性壊死を招来する[2, 4]。しかし、TNFは生体に対し、直接に投与すると副作用が強く臨床で多くの問題がある[1, 11]。

そこで、著者らは猫の乳腺腫瘍3症例に対し、TNF誘発剤を投与することにより担癌宿主にTNFを誘導する腫瘍の治療法（end-TNF/TNS療法）を実施したところ良好な治療効果が観察された。

材 料 お よ び 方 法

症例：症例は、神奈川県内の動物病院に来院した乳房部の腫瘍を主訴としたチンチラおよび日本猫2匹の計3症例であった。

症例1は、日本猫、雌、13歳、体重2.9kgであり、右第1乳房部から腋窩に及ぶ腫瘍（2.8×2×2cm）があり、胸水の貯留も認められた。病理学的診断から、この腫瘍は腺癌と診断され、単純X線所見より肺野に転移像を認めたため（T2a, N1, M1：ステージIV）、外科的摘出は困難と判断し、end-TNF/TNS療法を実施した。

症例2は、チンチラ、雌、14歳、体重4.5kgであり、左側第3乳房部に4.5×4×2cm大の腫瘍（T3a, N0, M0：ステージIII）を触知した。

症例3は、日本猫、雌、13歳、体重2.8kgであり、右最終乳頭部に4.8×4.5×2cm大の腫瘍（T3a, N0, M0：ステージIII）を触知した。

症例2および3では高齢であるとの理由から、飼いが外科的摘出術を望まなかったため、本療法を実施し

た。

end-TNF/TNS療法：有機ゲルマニウム（Ge-132）50mg/headを10日間連続で経口投与した後に、第一次刺激剤として *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 1mg/kgを6時間かけて点滴静脈内投与した。投与終了後、アンピシリン100mg/headを皮下注射し、合成ペニシリン製剤を50mg/head/dayで5日間経口投与した。*P. acnes*投与後5～7日目に第二次刺激剤として lipopolysaccharide (LPS) 10μg/kgを静脈内投与し、TNFの誘導を行った。

TNF活性の測定：TNFの測定はFrederick [3] や Kuwabara [6] らの方法に準じ、L₉₂₉細胞を用いたバイオアッセイ法により行った。L₉₂₉細胞2×10⁵個/mlを200μlずつ96wellの平底マイクロプレートの各wellに播種し、37℃、5%CO₂条件下で6時間培養した。培養上清除去後、0.4g/mlのアクチノマイシンDを含む10%牛胎児血清加MEM培養液を100μlずつ各wellに分注し、血清を2倍階段希釈して各濃度を4wellずつ添加し、同条件で20時間培養した。再度、培養上清を除去し、100μlのPBS⁻溶液で2回洗浄後、0.1%のクリスタルバイオレットを100μl各wellに添加して1時間生細胞染色し、色素を水洗により除去した。生細胞に取り込まれた色素量はマイクロELISAリーダーを用い、495nmの干渉フィルターで測定した。測定の標準品としてヒト組み換え型TNF-αを用い、あらかじめ標準曲線を作製し、この検量線と血清の希釈倍率とからTNF濃度を算出した。

治療効果測定：全症例に対しend-TNF/TNS療法実施前後に単純X線写真撮影を実施することにより治療

- 1 : TNS 療法実施前 第 1 乳腺部に正常組織との辺縁が不明瞭な陰影が観察される。
 2 : TNS 療法実施 2 日後 腫瘍は退縮している。
 3 : TNS 療法実施 1 週間後 さらに、腫瘍は退縮している。
 4 : TNS 療法実施 2 週間後 TNS 療法実施前に比較し、腫瘍は著明に退縮している。

図 1 症例 1 の TNS 療法実施前後の乳腺腫瘍の単純 X 線写真による評価

効果を判定した。

成 績

症例 1 : 症例 1 の腫瘍は、単純 X 線撮影で第 1 乳腺部の正常組織との辺縁が不明瞭で、無茎の広い付着部を持った均一な濃度を示す陰影が治療前に観察された (図 1-1)。また、肺野に転移像と胸水が確認された。end-TNF/TNS 療法を実施し、LPS 投与終了後 2 時間目において血中 TNF 濃度の測定を行ったところ 220U/ml という高レベルの TNF の誘導が認められた。LPS 投与後 2 日目には腫瘍の退縮が観察され (図 1-2)、胸水の減少も認められ、1 週間目にはさらに腫瘍は退縮した (図 1-3)。また、2 週間目に著明に退縮した乳腺部腫瘤 (図 1-4) に対して病理学的検査を実施したところ、腫瘍細胞の凝固壊死像が認められた (図 2)。しかし、本症例は治療半年後に他疾患により死亡した。

症例 2 : 症例 2 の腫瘍は第 2 乳腺部に辺縁の明瞭な無茎の限局した均一な濃度の陰影として観察された (図 3 A)。end-TNF/TNS 療法を実施し、LPS 投与終了後約 20 分目に 3 回嘔吐、粘液便の排出、元気消失といった一過性の副作用が観察されたが、翌日には元気は回復し、嘔吐、下痢ともに改善した。投与後 20 日目には腫瘍の形態的变化は観察されないものの、触診により若干の軟化を認めた。41 日目には腫瘍の中心部に融解壊死にと

図 2 症例 1 の TNS 療法実施 2 週間後の乳腺腫瘍の病理組織像 (HE 染色、弱拡大) 腫瘍組織の凝固壊死像がみとめられる。

もなった液体の貯留が認められたため、23G 注射針を用いて穿刺を行い、この貯留液を吸引したところ腫瘍の大きさは $1.1 \times 1 \times 0.8 \text{ cm}$ と治療開始前の $1/4 \sim 1/5$ 程度の大きさとなった (図 3A・B)。いっぽう、貯留液は 4 ml 回収され、淡黄色、透明の粘稠度の薄い漿液状のものであった。この貯留液に対し、病理学的検査を行ったところ、好中球、組織球、赤血球が観察されたものの腫瘍細胞の存在は認められなかった。また、この時点で血清を採取し、血中 TNF 濃度を測定したところ TNF 濃度はすでに検出限界以下であったが、貯留液中には 20.5U/ml の TNF が検出された。本症例は治療後 2 年を経過

A

B

(A) TNS 療法実施前

(B) TNS 療法実施 41 日後

腫瘍内部に漿液の貯留がみられ、これを吸引除去したところ著しい退縮がみられた。

図3 症例2のTNS療法実施前後の乳腺腫瘍の単純X線写真による評価

A

B

(A) TNS 療法実施前

(B) TNS 療法実施 35 日後

腫瘍内部に漿液の貯留がみられ、これを吸引除去したところ著しい退縮がみられた。

図4 症例3のTNS療法実施前後の乳腺腫瘍の単純X線写真による評価

した現在においても再発は認められず、良好な一般状態を維持している。

症例3：症例3の腫瘍は最後乳腺部に、辺縁の明瞭な有茎の可動性を有する均一な濃度の腫瘍が確認された(図4A)。

end-TNF/TNS療法を実施し、LPS投与終了後10分目に5～6回の嘔吐、粘液便排出、元気消失といった副作用を認めたが、症例2と同様に、これらの副作用は一過性のものであった。投与後35日目に腫瘍の大きさの変化は観察されなかったが、触診により中心部に症例2と同様、液体の貯留が認められた。その吸引除去後、その大きさは $1.4 \times 1.3 \times 1\text{cm}$ と治療前の1/4程度に退縮した(図4A・B)。貯留液の病理学的検査では、好中球、組織球が観察されたものの腫瘍細胞の存在は認められなかった。また、この時点で血清を採取し、血中TNF濃度を測定したがTNF濃度はすでに検出限界以下であった。貯留液については粘稠性が高かったためにTNF濃度を測定することはできなかった。本症例は治療後2年を経過した現在においても再発は認められず、良好な一般状態を維持している。

考 察

TNFは腫瘍壊死作用を持つ、マクロファージやリンパ球などが産生するサイトカインの一つである[8]。この報告は一次刺激剤として*P. acnes*を二次刺激剤としてLPSを用いてTNFの誘導を実施した。この組み合わせによって猫にTNFが誘導されることについてはすでに報告されている[7]。症例1においてはLPS投与後2時間目に 220U/ml という高濃度のTNFの産生がみられた。LPS投与後1週間目から著明な腫瘍の退縮が観察されるようになり、2週間目には凝固壊死を示していた。症例2と3においてはLPS投与後5～6週間目から腫瘍の形態に特異的な変化が起ころはじめ、内部に液体を貯留し、これらの腫瘍に中心性の融解壊死が引き起こされていることが観察された。特に、症例2では貯留液体から 20.5U/ml のTNFが検出された。この腫瘍の組織が壊死を起こしている時点では、両症例ともすでに血中TNF活性は検出限界以下であった。これらの乳腺腫瘍の症例から、end-TNF/TNS療法においてはTNFはLPS投与後全身に存在するマクロファージから

早期に産生され、その後速やかに血中からは消失するものの、腫瘍が存在している局所においては TNF が長期間産生されるため、腫瘍組織に対して初期には凝固壊死を引き起こし、後には融解壊死に至らせるものと推察された。この腫瘍局所における長期間の TNF の産生は腫瘍組織に浸潤している腫瘍傷害性マクロファージが LPS 投与により活性化され、TNF 産生と同時に直接の腫瘍傷害性も上昇するため[12]、他の部位に存在しているマクロファージに比較してより強力に活性化し、TNF 産生におけるオートクライン作用を強く示すことによるものと考えられる。

著者らが実験的に猫に内因性 TNF の誘導を試みたところ、LPS 投与後 2 時間目に血中 TNF の濃度はピークを示し 4 時間目には消失していた（データは示していない）。この実験結果からも誘導された TNF は全身に長期間存在するものではなく、比較的早期に血中からは消失するものと考えられる。また、担癌動物にあっては TNF の誘導後には腫瘍に対する特異的免疫を獲得することも報告されており[9]、end-TNF/TNS 療法の有用性のひとつを示すものと思われる。

TNF は非常に強力な抗腫瘍作用を有しているが、カケチン作用、血圧低下や発熱作用などの副作用をともなう。人においてはヒト組み替え型 TNF- α を担癌例に全身投与した場合には著効例は少ない[14]。いっぽう、峠ら[13]、Pfreundschuh ら[10]により腫瘍内投与ではかなりの症例で有効性が確認されており、その上、副作用の出現頻度も少ないと報告されている。

end-TNF/TNS 療法は担癌マウスにおいて生存率を 2 倍以上延長させること[15]、人の大腸癌で 65～85%、子宮肉腫で 20～50% も腫瘍退縮率が得られたことが報告されている[5]。今回の猫の乳腺腫瘍 3 症例の全症例において、腫瘍が著明に退縮した。特に、転移の認められなかった 2 症例では治療後約 2 年を経過した時点でも

腫瘍の再発は認められていない。

以上のような点から、本治療法は臨床上きわめて有効な治療法のひとつである。

本稿を終えるに当たり、ご協力をいただいた横浜市開業、広瀬 学先生および東京都開業、石井 悟先生ならびに日本大学獣医生理学研究室、成相孝一氏に深謝する。

引用文献

- [1] Blick M, Sherwin SM, Rosenblum M, et al : Cancer Res, 47, 2986-2989 (1987)
- [2] Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al : Proc Nat Acad Sci USA, 72, 3666-3670 (1975)
- [3] Frederick C, Kull J, Cuatrecasas P : J Immunol, 126, 1279-1283 (1981)
- [4] Herberman RB : Drug Res, 7, 246-250 (1987)
- [5] 加藤幹雄：セラピューティック・リサーチ, 7, 343-350 (1987)
- [6] Kuwabara M, Koide F : J Assoc Comp Clin Hematol Z, 2, 30-39 (1993)
- [7] 桑原正人, 小坂俊文, 小出英興 : J Mod Vet Med, 4, 20-23 (1993)
- [8] 大沢利昭：現代科学 増刊 18 サイトカイン—免疫応答および細胞の増殖・分化因子—, 137-149, 化学同人, 東京 (1990)
- [9] Palladino MA, Jr, Patton JS, Figari IS, et al : Ciba Foundation Symposium 131, Tumor necrosis factor and related cytotoxins, 21-38, John Wiley & Sons, New York (1987)
- [10] Pfreundschuh MG, Steinmetz HT, Tuschen R, et al : Eur J Cancer Clin Oncol, 25, 379-388 (1989)
- [11] 田口鐵男：癌と化学療法, 13, 3491-3497 (1986)
- [12] 漆崎一朗：Bioscience Books 2 サイトカインと癌治療, 59-73, 140-165, ライフ・サイエンス, 東京 (1989)
- [13] 峠 哲哉：セラピューティック・リサーチ, 10, 275-282 (1989)
- [14] 渡辺直樹, 新津洋司郎：今日の臨床免疫, 19, 721-727 (1990)
- [15] 山本章博：癌と化学療法, 13, 2358-2364 (1986)

Therapeutic Effect of Endogenous Tumor Necrosis Factor Induction on Mammary Tumors in Cats

Youko NAKADA, Sadatoshi MAEDA, Miyuki MIYAMORI, Tadashi TAKAHASHI, Akira MORIYAMA and Masato KUWABARA

College of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa 252, Japan

SUMMARY

Therapeutic induction of endogenous tumor necrosis factor (TNF) was applied to three aged female cats with mammary tumors. In a case of adenocarcinoma with lung metastasis, the mammary tumor remarkably reduced in size on the 7th day post-therapy, showing coagulation necrosis with decreased pleural effusion and improved general conditions. In two other cases, the tumors significantly reduced in size after TNF induction. TNF activity was detectable from the tumor effusion.

—Key words : cat, mammary tumor, TNF induction.

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 50, 161~164 (1997)